

10/508815

Rec'd PCT/PTO

11 JAN 2006

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/083474 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/00, C12M 1/00, C12N 15/00

G01N 33/53,

(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI, Sumio et al.); 〒169-8925 東京都新宿区高田馬場三丁目2番3号ORビル Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03853

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 27 日 (27.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-91570 2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002) JP
特願2003-1111 2003 年 1 月 7 日 (07.01.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリンパス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 秋本 佳伸 (AKIMOTO, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒185-0032 東京都国分寺市日吉町1-33-20 Tokyo (JP). 福岡 荘尚 (FUKUOKA, Morinao) [JP/JP]; 〒229-0003 神奈川県相模原市東淵野辺1-13-1-409 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TEST PIECE FOR ANALYZING SUBSTANCE WITH BIOLOGICAL ORIGIN, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD OF EXAMINING TEST PIECE FOR SUBSTANCE WITH BIOLOGICAL ORIGIN

(54) 発明の名称: 生体由来物質解析用試験片、その製造方法、及び生体由来物質用試験片の検査方法

(57) Abstract: A process for producing a test piece for analyzing a labeled substance with a biological origin which comprises the step of supplying a solution containing a substance capable of specifically binding to the substance with the biological origin onto a support and fixing the specifically binding substance at a definite position on the support, characterized in that the solution contains a substance to be detected, which is either the same as the label or different therefrom, uniformly dissolved or dispersed therein independently from the specifically binding substance. A method of examining a test piece having a substance specifically binding to a substance with a biological origin fixed at a definite position on a support, characterized by comprising the step of supplying a labeled test substance onto a support and fixing it at a position different from the position of the specifically binding substance, and the step of eliminating the unfixed test substance.

(57) 要約: 担体上に、生体由来物質に対する特異的結合物質を含む溶液を供給し、担体上の所定位置に特異的結合物質を固定する工程を含む、標識化された生体由来物質解析用試験片の製造方法において、その溶液が、当該標識とは異なる又は同一の被検出物質を、特異的結合物質とは独立に、溶解して又は均一に分散して含むことを特徴とする方法。担体上の特定個所に、生体由来物質に対する特異的結合物質を固定化させた生体由来物質用試験片の検査方法であって、標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所に固定化する工程と、固定化されなかった検査物質を除去する工程とを有することを特徴とする方法。



WO 03/083474 A1

明細書

生体由来物質解析用試験片、その製造方法、 及び生体由来物質用試験片の検査方法

技術分野

本発明は、遺伝子等の生体由来物質の解析等に使用することが可能な生体由来物質解析用試験片、その製造方法、及び生体由来物質用試験片の検査方法に関する。

背景技術

遺伝情報の解析方法は、主として二つに分類できる。一つは、遺伝子自体及び遺伝子から発現するmRNAや蛋白質が「どのようなものであるか」を解析するものである。もう一つは、そのmRNAや蛋白質が「如何なる条件下で発現するか」を解析するものである。前者に属する方法としては、ウェスタン・ブロット法、ノーザン・ブロット法、サザン・ブロット法等があり、これらは主に、注目する蛋白質や、DNA又はRNAについての解析を行うためのものである。

一方、後者に属するものとしては、転写因子の相互作用や、シグナルトランスダクションの解析等が該当する。しかしながらこれも主に、単一の注目する遺伝子について解析を行うことを目的としており、ある時点で細胞内において発現している遺伝子群を一度に総合的に解析することは困難である。

近年、DNAチップやDNAマイクロアレイとよばれる、1センチ四方程度の大きさの担体表面上に高密度に任意のオリゴヌクレオチドを固定化する技術が開発されたため、ある時点において細胞内で発現している遺伝子群を一度に総合的に解析することが可能になりつつある。

DNAチップは、シリコンチップをフォトリソグラフィ技術により多くの区画に分割し、それぞれの区画上に特定の塩基配列を持つ一本鎖DNAを直接合成

したものである。一方、DNAマイクロアレイは、従来、約 $300\mu\text{l}$ 以上の量でメンブレン上にスポットされていたDNAを、約 200pl 程度の量でスライドガラス上にスポットしたものである。

このようなDNAチップやDNAマイクロアレイは、チップやマイクロアレイ上の核酸の種類や配置を適宜変更し、信号読取装置及びコンピュータシステムに接続して用いれば、遺伝子の変異解析、多形解析、塩基配列解析、発現解析など、種々の用途に使用することが可能になる。

DNAマイクロアレイを利用した遺伝子解析は、利用が始まったばかりであり、マイクロアレイの製造やその検出装置については、現時点では様々な問題が存在している。例えば、マイクロアレイはスポッター装置と呼ばれるものでオリゴDNA又はcDNAをプロットして作製されるが、その作製方法としては、スライドガラス上にピンを直接接触させてオリゴDNA又はcDNAを配置する接触プリンティング法や、スライドガラス上にインクジェット技術を用いて、オリゴDNA又はcDNAをプロットする非接触プリンティング法がある。

接触プリンティング法においては、スライドガラス等からなる担体に対して、オリゴDNAやcDNA等の試料をスポットするためのピンを直接接触させて、試料を担体上に配置する。一方、非接触プリンティング法においては、印刷分野等で使用されるインクジェット技術を利用して、試料を担体上にスポットする。

何れのプリンティング方法においても、担体上にスポットされた各スポット間で、量のばらつきがあったり、各スポットの形状が均一でなかったり、時には特定のスポットには試料が全く配置されないといった問題を生じることがある。また、スポットの位置にずれを生じることもある。このような問題は、この方法により製造されたDNAマイクロアレイ製品の品質上の問題を生じさせる。即ち、このような欠陥のあるマイクロアレイは、定量性の要求される解析には使用することが不適切であり、また、場合によっては定性的な解析においてさえも信頼性のない結果を提供してしまう。更に、欠陥の程度によっては、そのマイクロアレイを製品として出荷できなくなり、製造における歩留まりを悪化させるという問題が生じる。ばらつきの度合いとしては、現時点では数%乃至数十%程度のものは避けられないとされている。

これらの問題点に鑑み、特開 2 0 0 0 - 2 3 5 0 3 6 号公報においては、担体上の所定の複数位置に、互いに異なる複数の既知の特異的結合物質がそれぞれ配置された、標識物質で標識された生体由来物質の解析に用いられる試験片であって、前記特異的結合物質が標識物質で標識された試験片、及びそれを用いた生体由来物質の定量方法が提案されている。

しかしながらこの方法においては、担体上に配置された特異的結合物質の量を検出するための標識（蛍光標識等）を行うことに起因して、コストアップや製造工程の複雑化等の問題が生じる。例えばオリゴDNAを特異的結合物質として担体へ配置させる場合には、オリゴDNAを担体へ結合させるために、オリゴDNAに、 $-NH_2$ や $-SH$ 等の標識を付加するのみならず、オリゴDNA自身の検出のための標識も行うことが必要となる。従ってこの方法ではオリゴDNAに対して2種類の標識を行うことになる。このような問題は、多種類の特異的結合物質を担体へ配置する、DNAマイクロアレイの場合にはより顕著になる。

また、複数の標識を使用する場合には、標識の種類によっては被標識物質への結合に関しての位置的制限があるために、標識物質の種類や、標識位置に関しての制限も存在するという問題がある。即ち、Cy 3やCy 5等の蛍光色素を使用する場合には、核酸の5'末端側にしか標識することができないため、特異的結合物質の担体への結合のための標識は、3'末端側を利用しなくてはならないという制限事項も課せられる。従って、特開 2 0 0 0 - 2 3 5 0 3 6 号公報に記載の方法の場合には、標識の組合せについての制限が存在し、DNAマイクロアレイシステムの設計上の自由度に制限があることになる。

更に、特異的結合物質の標識から放出される信号の量の検出結果と、生体由来物質の標識から放出される信号の量の検出結果とを比較するためには、それぞれに別の種類の標識物質を使用する必要があり、それぞれの標識物質の選択に関しての制限が存在する。

このような、プリンティング方法に起因する問題のみならず、特開平 1 1 - 1 8 7 9 0 0 号公報に開示されているように、オリゴDNA又はcDNAを100%固定することは化学反応的に困難で、担体上にオリゴDNA又はcDNAが

固定化されているかどうかの確認は、実際のハイブリダイゼーションで判断するしかないという問題も存在している。

従って、コスト、及び製造工程の簡潔性の観点からは、より低コストで、簡便であり、設計上の自由度が高く、且つ簡便に試験片の検査を行うことが可能な、生体由来物質試験片を製造する方法が望まれる。

斯かる問題を解決する方法としては、スポッターの改良を行い、スポット間でのばらつきを有意に低減する方法、そして固定化に悪影響を与える担体の品質不良を確認する方法とが挙げられる。

スポッター自体の改良を行う場合には、数 p l 乃至数百 p l 程度の単位の液量を正確に、再現性よく担体上に配置する必要があるが、これにはおのずと限界がある。

従って本発明は、スポット間での量のばらつきや、スポット形状の不均一性や、スポットの位置ずれ等の問題が生じて、それを検知することが可能であり、しかも大幅なコストアップや製造工程の複雑化等の問題を生じることのない生体由来物質解析用試験片の製造方法、及び該方法により得られる生体由来物質解析用試験片を提供することを目的とする。

更に本発明は、固定化されない要因の一つである担体の品質不良に着目し、特異的結合物質とは別に、標識された検査物質を担体上に固定化し、該担体から固定化されなかった検査物質を除去することによって、担体が生体由来物質用試験片の製造に適しているか否かを簡便に確認できる工程を含む検査方法、並びにこの検査方法を含んだ生体由来物質解析用試験片の製造方法、及び当該方法により得られる生体由来物質解析用試験片をも提供することを目的とする。

発明の開示

上記課題を解決し、目的を達成するために本発明の生体由来物質試験片の製造方法は、以下のごとく構成されている。

即ち、本発明の生体由来物質試験片の製造方法は、担体上に、生体由来物質に対する特異的結合物質を含む溶液を供給し、当該所定位置に当該特異的結合物質

を固定する工程を含む、標識化された生体由来物質解析用試験片の製造方法において、当該溶液が、当該標識とは異なる又は同一の被検出物質を、当該特異的結合物質とは独立に、溶解して又は均一に分散して含むことを特徴とする。

当該生体由来物質解析用試験片の製造方法においては、前記溶液を供給する工程、又は前記特異的結合物質を固定する工程の後に、前記被検出物質を検出する工程を更に含むことが好ましく、この場合には前記被検出物質を検出する工程の後に、当該被検出物質を前記担体より除去する工程を更に含んでもよい。

また、本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法においては、前記被検出物質を検出する工程は、当該被検出物質についての、前記担体上の位置、形状、数、及び濃度の少なくとも1つを検出する工程であることが好ましい。

本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法においては更に、前記被検出物質は、前記生体由来物質、前記特異的結合物質、及び当該生体由来物質と当該特異的結合物質との複合体に特有の分光学的性質とは異なる分光学的性質を有することが好ましい。そして本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法においては、前記の分光学的性質は、吸光度であることが好ましい。そして前記被検出物質は、インク、色素、顔料からなる群より選択することができる。

本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法においてはまた、標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所に固定化する工程、及び固定化されなかった当該検査物質を除去する工程を含む担体検査工程を含むことを特徴としている。更に本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法においては、前記の固定化されなかった当該検査物質を除去する工程の後に、固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する工程を有することが好ましい。

本発明の生体由来物質解析用試験片は、本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法により製造されたものであり、より具体的には、前記の生体由来物質に対する特異的結合物質がDNAである、DNAチップ又はDNAマイクロアレイである。

本発明の生体由来物質用試験片の検査方法は、担体上の特定個所に、生体由来物質に対する特異的結合物質を固定化させた生体由来物質用試験片の検査方法であって、標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所

に固定化する工程と、固定化されなかった検査物質を除去する工程とを有することを特徴とする。また、本発明の生体由来物質用試験片の検査方法においては、前記の固定化されなかった検査物質を除去する工程の後に、固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する工程を有することが好ましい。

更に本発明の生体由来物質用試験片の検査方法は、担体上の特定個所に、生体由来物質に対する特異的結合物質を固定化させた生体由来物質用試験片の検査方法であって、被検出物質と特異的結合物質との混合物を担体上に供給し、特異的結合物質を特定個所に固定化する工程と、標識された検査物質を担体上に供給し、前記固定化工程の特定個所とは異なる他の特定個所に固定化する工程と、前記二つの固定化工程にて固定化されなかった特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程とを有することを特徴とする。また、本発明の生体由来物質用試験片の検査方法においては、前記固定化されなかった特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程の後に、担体上に残存する被検出物質及び固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する工程を有することが好ましい。

発明を実施するための最良の形態

(定義)

本発明においては以下の用語は、以下に定義した意味において用いる。

「生体由来物質」とは、動物、植物、微生物等の細胞のみならず、これらに寄生しなければ自ら増殖できないウイルス等に由来する物質をも含み、具体的には蛋白質、核酸等が含まれる。生体由来物質は、これらの細胞等より直接抽出・単離された天然形態のもののみならず、遺伝子工学的手法を利用して生産されたもの、及び化学的に修飾されたものや化学的に合成されたものをも含む。より具体的には、生体由来物質には、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アプザイム、その他の蛋白質、核酸、cDNA、DNA、mRNA等の物質が含まれる。本発明においては、生体由来物質は、蛍光物質等により標識化されたものであるが、その標識物質とその標識方法に関しては、当該技術分野で知られるもの

であれば特に限定されず、生体由来物質の検出系とのかねあいで決まるものである。

「特異的結合物質」とは、上記の生体由来物質に対して特異的に結合する物質を意味し、具体的にはホルモン等のリガンドとその受容体、酵素とその基質、腫瘍マーカー等の抗原とそれに対する抗体、特定配列を有する核酸とこれに相補的な配列の核酸等の関係にある、何れのものが含まれる。

「試験片」とは、担体上で一定の配置をとるように設計された複数のスポットを、それぞれのスポットの表面に物質を固定することができるように処理されて含むものであって、適宜、当該物質が当該スポットに固定化され、当該物質及びこれに結合する他の物質を各スポットにおいて結合させ、当該物質と当該他の物質との間に形成される複合体を検出するために使用するものを意味する。試験片には、DNAチップ及びDNAマイクロアレイが含まれる。

「被検出物質」とは、生体由来物質とは別の物質であって、生体由来物質、特異的結合物質、及びこれらの複合体に特有の分光学的性質とは異なる分光学的性質を有するものを意味する。

「検査物質」とは、担体の品質を確認するために使用される物質であって、上記特異的結合物質と担体との間の結合様式と同様の結合様式をとるものであれば使用することが可能である。具体的には、上記特異的結合物質と同様の物質でも良いが、生体由来物質に対して特異的に結合する必要はない。

以下においては、本発明の実施態様についての、構成、実施方法、及び効果等について説明する。

一の態様において本発明の生体由来物質試験片の製造方法は、担体上に、生体由来物質に対する特異的結合物質を含む溶液を供給し、当該所定位置に当該特異的結合物質を固定する工程を含む、標識化された生体由来物質解析用の試験片の製造方法において、

当該溶液が、当該標識とは異なる又は同一の被検出物質を、当該特異的結合物質とは独立に、溶解して又は均一に分散して含むことを特徴としている。

本願発明において使用する、特異的結合物質を含む溶液（又は分散系若しくは懸濁液）は、検出する標識とは異なる又は同一の被検出物質をも含んでいる。そ

してこの被検出物質は、特異的結合物質とは独立して、該溶液中に溶解し、又は均一に分散若しくは懸濁して含まれている。独立して溶解又は分散若しくは懸濁しているとは、特異的結合物質と被検出物質とを予め化学的に結合させることなく、それぞれが別個の溶質又は分散相として該溶液（分散液若しくは懸濁液）中に均一に含まれていることを意味する。更に当該被検出物質は、当該特異的結合物質と当該生体由来物質との結合に対して阻害する効果のないものであることが好ましい。

本発明の方法において使用する担体は、特異的結合物質の固定化に適するものであれば特に限定されるものではないが、例えばスライドガラス、シリコンウエハ、メンブレンフィルタ等のように各区画が平面的に設けられる担体の他に、多孔質構造の担体であってもよい。多孔質構造の担体としては、三次元的に液体を収容し得る微小な液体収容部を複数位置してなるような、例えばアルミニウム陽極酸化膜が挙げられる。ここで、液体収容部は、特異的結合物質を固定するための最小単位である。このような多孔質構造の担体は、1つの液体収容部に多量の特異的結合物質を固定化することができ、且つ特異的結合物質を定量的に固定化することができることから、発現量の解析などの定量的な実験に好適である。また、シリコンウエハをエッチングして作製した多孔質担体でも適用することは可能である。

本発明の方法においては、特異的結合物質が担体上に固定化された量を検出するための標識を、当該特異的結合物質に直接結合させることはないので、特異的結合物質の調製のコスト及び手間の点で、利点があり、非常に安価且つ簡便に試験片を調製することが可能となる。また、特異的結合物質への標識は、担体上への固定化のための一種類でよいことから、標識の選択に関する自由度が高い。更に、担体上に特異的結合物質が正確に、設定通りにスポットされたかを確認できるので、この方法により調製される試験片を、定量的な分析に使用することが可能となるのみならず、製品の品質保証を確実にすることができるようになる。

本発明の方法においては、上記の溶液を担体上に供給した後に、被検出物質を検出する工程を更に含めることもできる。即ち本発明の方法においては、被検出物質の検出を製品の品質検査工程として、製造段階で実施することができる。ま

た、被検出物質の除去を製造工程中に行わず、ユーザが試験片の使用前に試験片の品質を確認することができるようにすることも可能である。

本願発明の方法において、被検出物質を検出する工程を含める場合には、その工程の後に、被検出物質を担体より除去する工程を更に含めることもできる。除去方法としては、担体上に固定化された特異的結合物質が担体より除去されないようにして、被検出物質のみを選択的に除去できる方法であれば特に限定されることはない。具体的には、生体由来物質及び被検出物質を含む溶液において使用したものと同一の組成の溶媒や、塩濃度やpH等をそれらとは変更したもの等が挙げられるが、これらには限定されない。被検出物質が、特異的結合物質と生体由来物質との複合体の検出に影響を与える可能性のある場合には、被検出物質は試験片の利用前に除去することが好ましい。しかしながら本発明の方法の実施において、被検出物質に、生体由来物質の検出に影響のないものを使用する場合には、特異的結合物質の担体への固定化の後で、被検出物質を除去する工程をはぶくこともできる。これは、工程の単純化、及び除去工程中に、特異的結合物質が担体より解離してしまう可能性をなくす上で好ましい。

本願発明の方法において、被検出物質を検出する工程においては、前記担体上の位置、形状、数、及び濃度の少なくとも1つを検出することが好ましい。担体上の被検出物質の位置、形状、及び数についての情報は、これらが試験片の設計と一致するかどうかを確認し、試験片の品質を確認する上で有益である。ここで、スポットの形状には、サテライトスポットの有無の確認が含まれる。サテライトスポットとは、インクジェット方式で溶液を担体上にスポットする場合に、担体上で液滴が一つにはならず、1のより大きな液滴と、その近傍の小さな、少なくとも1の液滴（飛沫によるもの）とが生じることがあるが、その場合の飛沫による液滴を意味する。このようにサテライトスポットが生じた場合には、そのスポットは試験片の使用時には使用しないことが好ましい。

一方、担体上の被検出物質の濃度についての情報は、使用する被検出物質についての検量線を予め作成しておけば、試験片の担体上に実際にスポットされた特異的結合物質の量の検定や補正に利用することができる点で、有益である。

試験片上の被検出物質のスポットの検査は、例えばCCDカメラ等で、試験片の画像を取込み、画像処理を行って、その結果が予め設定したものと適合しているかを確認することにより行うことができる。この操作は、適宜コンピュータを利用して、大量に行うことができ、また、検査により得られたデータと、その検査に使用した試験片との組合せとをデータベースにより組み合わせて管理すれば、試験片上の特異的結合物質の量についての品質管理を行うことができ、更にその量についての情報とセットにして試験片を市場に流通させれば、ユーザーが試験片を用いて得られたデータの補正を行うことが可能になり、より高い精度の定量性が要求される実験にも、本発明の試験片を使用することができるようになる。

本発明の方法において使用する被検出物質は、前記生体由来物質、前記特異的結合物質、及びこれらの複合体に特有の分光学的性質とは異なる分光学的性質を有するものであり、好ましくは分光学的性質は、吸光度である。被検出物質を検出する方法には、使用する被検出物質の分光学的性質に応じ、適したものを利用するが、例えば、被検出物質に特有の波長、例えば可視光、紫外線、赤外線領域のスペクトルを測定する方法が挙げられる。可視光領域のスペクトルを測定する場合には、検出系のコストを抑えることができるため好ましい。

本発明の方法においては、被検出物質として、インク、色素、顔料からなる群より選択されるものを使用できる。更に具体的には、蛍光色素（Cy 3、Cy 5、ローダミン、タムラ、FITC等）、カーボンブラック、黒色酸化鉄、ベンガラ、オレンジG、アゾ色素、フタロシアニン系色素、蛍光インク、蛍光顔料、量子ドットと呼ばれる、例えば金や銀、シリコン、その他各種半導体のnmオーダーの粒径を持つ微粒子も挙げられる。特異的結合物質を担体上にプリントするときに、特異的結合物質の調製に水を用いることが多く、上記被検出物質は、水に溶解するもの又は水に分散するものが好ましい。また、被検出物質は、特異的結合物質と直接的に結合しないものである。

被検出物質の量は、特異的結合物質を含む溶液中に溶解又は均一に分散若しくは懸濁でき、その後の工程において検出ができる量であれば特に限定されることなく、特異的結合物質の担体への結合や、担体に結合した特異的結合物質と、

これに特異的な生体由来物質との間の複合体形成を阻害することのない量であることが好ましい。

尚、担体上への特異的結合物質の固定は、特異的結合物質の種類と、担体の固定化面の性質に応じて、本願の関連する技術分野において知られる何れの方法を用いて行うことができる。例としては、Biochem. Biophys. Res. Commun.

[1] (1978) 1-6, Nucleic Acids Res. [16] (1988) 10861-10880 等の文献に記載されている方法が挙げられる。

また本発明は、標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所に固定化する工程と、固定化されなかった検査物質を除去する工程とを有することを特徴とする生体由来物質用試験片の検査方法を提供するが、標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所に固定化する工程において使用する標識された検査物質とは、蛍光、放射性同位元素、化学発光、量子ドット等を公知の方法により検査物質に直接又は間接的に結合させて標識されたものであって、適当な手段によりシグナルとして適宜検出・測定されるものを示す。また、検査物質としては特異的結合物質と同類のものをを用いることができ、例えば、特異的結合物質としてオリゴDNAを用いた場合は、検査物質としてもオリゴDNAを用いることができる。

標識された検査物質を固定化させる方法としては、検査物質の種類や、担体上の固定化面の性質に応じて、本発明の関連する技術分野において知られる何れの方法を用いても行うことができ、担体上への特異的結合物質の固定と同様の方法が挙げられる。

本発明の検査方法中の、固定化されなかった検査物質を除去する工程においては、既に固定化された特異的結合物質と固定化された検査物質とが担体より除去されないようにして、固定化されなかった検査物質を除去できる何れの方法をも利用することができる。具体的には、例えば、特異的結合物質、検査物質を含む溶液において使用したものと同一の組成の溶媒、塩濃度やpH等をそれらとは変更したものや、滅菌水等を用いて担体を洗浄し、乾燥させる方法が挙げられる。このとき、固定化されなかった特異的結合物質も一緒に除去してもよい。

この工程の後、固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する。そして、検査物質の標識由来のシグナルが検出されれば、特異的結合物質の結合に適した、すなわち試験片の製造に好適な担体であると判断することができる。逆に、検査物質の標識由来のシグナルが検出されなければ、担体の品質不良により、試験片の製造に適さないものであると判断することができる。更に、この工程は、ユーザーが試験片の使用前に、試験片の品質を確認する目的で行うこともできる。

本発明は更に被検出物質と特異的結合物質との混合物を担体上に供給し、特異的結合物質を特定個所に固定化する工程と、標識された検査物質を担体上に供給し、前記の特異的結合物質の固定化工程の特定個所とは異なる他の特定個所に固定化する工程と、これらの工程において固定化されなかった特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程とを有することを特徴とする、生体由来物質用試験片の検査方法をも提供する。

なお、この実施形態の発明の説明においては、上記の他の実施形態と同様の構成、実施方法をとることができる点については省略する。

本実施形態の発明における、固定化されなかった特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程における除去方法としては、固定化された特異的結合物質および固定化された検査物質が担体より除去されないようにして、固定化されなかった特異的結合物質、検査物質を選択的に除去し、且つ、特異的結合物質と混合され、特異的結合物質に付着された被検出物質を除去できる方法であれば特に限定されない。具体的には、例えば、特異的結合物質、検査物質を含む溶液において使用したものと同一の組成の溶媒、塩濃度やpH等をそれらとは変更したものや、滅菌水等を用いて担体を洗浄し、乾燥させる方法が挙げられる。

この工程の後、担体上に残存する被検出物質、及び固定化された検査物質由来のシグナルを検出する。そして、被検出物質のシグナルが検出されず、且つ検査物質の標識由来のシグナルが検出されれば、特異的結合物質の結合に適した、すなわち試験片の製造に好適な担体であると判断することができる。

本実施形態において、被検出物質は、固定化されなかった特異的結合物質、及び検査物質が完全に除去されたか否かの指標となる。即ち、特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程において固定化されなかった特異的結合

物質、及び検査物質の除去が不完全であると、実際には担体が不良であっても、固定化されなかった検査物質が担体上に残存することによって、誤った検査結果を導くことになってしまう。なお、この工程は、ユーザーが試験片の使用前に、試験片の品質確認する目的で行うこともできる。

また本発明は、上記の製造方法により製造された生体由来物質試験片も提供する。本願発明の方法により製造された試験片は、従来の方法により製造された試験片と比較すると、担体上の所定の位置に特異的結合物質が、設定通りにスポットされたかを調べたものであるか、又はユーザーが使用時にすぐに調べることができるようになっていくという構成において異なっている。このような差異は、従来の試験片では不可能又は不十分であった、定量性が要求される試験にも使用できるという点において、従来技術の試験片にはない利点を有している。また、ハイブリダイゼーション反応を行わなくても、担体の品質不良に基づく、製品の欠陥を知ることができるので、ユーザーによるサンプルの無駄遣いを防止することができ、担体不良に起因した、特異的結合物質の固定化が設計通りに実施されないことを予測でき、それらを製造段階において省くことによって、製造歩留まりを向上させ、且つ、品質に優れたもののみを製品として出荷することができるものとなっている。

本発明の生体由来物質試験片には、DNAチップ及びDNAマイクロアレイが含まれるが、特異的結合物質を適宜変更することにより、DNA以外の核酸や、その他の生体由来物質、例えば蛋白質の試験にも応用することが可能である。

実施例

(実施例 1)

1 重量% (wt%) のポリ-L-リジン溶液で表面を前処理した、76 mm X 26 mm X 1 mm のスライドガラスを担体とするDNAマイクロアレイを使用した。互いに異なる複数の、塩基配列が既知のアミノ標識オリゴDNAを特異的結合物質として使用した。被検出物質としては、蛍光色素のFITC (フルオレセインイソチオシアネート) を使用した。特異的結合物質及び被検出物質をともに溶解

した溶液を調製し、DNAマイクロアレイの担体上の所定の位置に、スポッターを利用して、100 p l の、特異的結合物質と被検出物質との溶液をスポットして、特異的結合物質が担体上の所定位置に固定化されたDNAマイクロアレイを作製した。

CCDカメラを有する蛍光顕微鏡（オリンパス社製BX-51）により、DNAマイクロアレイ上の各スポットの大きさ、形状、蛍光量、配置を計測し、これらが予め定めておいた基準値内であるか否かを画像分析により確認した。

DNAマイクロアレイ上の各スポットの大きさ、形状、蛍光量、配置は、何れも蛍光顕微鏡を用いた画像分析システムにより、非常に簡単に確認することができた。

（実施例2）

実施例1でDNAマイクロアレイ上の各スポットの大きさ、形状、蛍光量、配置を計測し、これが予め定めておいた基準内であることを確認した後に、作製したマイクロアレイを100 ml の0.2 X SSC 溶液により3回洗浄して、被検出物質であるFITCを除去した。次に、生体由来物質の核酸にFITCを標識して、マイクロアレイ上の特異的結合物質に結合させた。マイクロアレイ上の被検出物質を洗浄せずに生体由来物質を結合させたときよりも良好なシグナル/ノイズ比で生体由来物質を検出することができた。

（実施例3）

被検出物質として粒径が0.5 μ m以下の粒子のカーボンのコロイド粒子を分散させる以外は実施例1の操作と同様にして、DNAマイクロアレイへの特異的結合物質の固定化の検査を行った。

蛍光色素ではなく、可視光領域で特徴的な吸収スペクトルを有する被検出物質を使用しているため、実施例1よりも、簡便な検出系で検出を行え、また、黒色であることから二値化しやすく、画像処理もより容易となった。このように、非蛍光物質を被検出物質として利用しているため、蛍光標識で標識した生体由来物質の検出には、より有利である。

(実施例 4)

ポリカルボジイミド樹脂をコーティングしたスライドグラスに、100種類の既知の無標識のオリゴDNAと、1種類の既知の5'末端にF I T C（フルオレセインイソチオシアネート）標識したオリゴDNA（検査オリゴ）とをインクジェット方式のスポッターを用いて所定の位置に固定化した。

このスライドグラスをP B Sバッファー及び滅菌水で順次洗浄して、固定化されなかったオリゴDNAをスライドグラスから除去した。スライドグラスを乾燥機にて乾燥させた後、蛍光顕微鏡にて検査オリゴが固定化されているであろう位置を観察したところ、蛍光を確認した。従って、100種類の既知の無標識のオリゴDNAは、設計通りに所定の位置に固定化されたと判断した。

次いで、このスライドグラスに、100種類のオリゴDNAと特異的に結合するDNAを含む、標識化された試料を接触させて、洗浄した後、検出したところ、100種類全てのスポットから十分な強度を有した良好なシグナルが確認された。

(実施例 5)

ポリ-L-リジンコーティングしたスライドグラスに、100種類の既知の無標識のオリゴDNAと、1種類の既知の5'末端にF I T C（フルオレセインイソチオシアネート）標識したオリゴDNA（検査オリゴ）とをインクジェット方式のスポッターを用いて所定の位置に固定化した。このスライドグラスをP B Sバッファー及び滅菌水で順次洗浄して、固定化されなかったオリゴDNAをスライドグラスから除去した。スライドグラスを乾燥機にて乾燥させた後、蛍光顕微鏡にて検査オリゴが固定されているであろう位置を観察したところ、蛍光を確認した。従って、100種類の既知の無標識のオリゴDNAは、設計通りに所定の位置に固定化されたと判断した。

次いで、このスライドグラスに、100種類のオリゴDNAと特異的に結合するDNAを含む、標識化された試料を接触させて、洗浄した後、検出したところ、100種類全てのスポットから十分な強度を有した良好なシグナルが確認された。

(実施例 6)

活性アルデヒドグループを表面修飾したスライドグラスに、100種類の既知の5'末端をアミノ修飾し、C y 3色素を混入させたオリゴDNAと、1種類の

既知の5'末端にアミノ修飾、3'末端にFITC（フルオレセインイソチオシアネート）標識したオリゴDNA（検査オリゴ）とをインクジェット方式のスポットターを用いて所定の位置に固定化した。洗浄する前にCy3色素を検出して、スポットの位置を確認した後に、このスライドガラスをPBSバッファー及び滅菌水で順次洗浄して、固定化されなかったオリゴDNAをスライドガラスから除去した。スライドガラスを乾燥機にて乾燥させた後、蛍光顕微鏡にて100種類のオリゴDNAが固定されているであろう位置を観察したところ、Cy3の蛍光が観察されなかったため、固定化されなかったCy3色素を混入させたオリゴDNA、及び検査オリゴは除去されたと判断した。また、検査オリゴが固定されているであろう位置を観察したところ、蛍光を確認した。従って、100種類の既知のオリゴDNAは、設計通りに所定の位置に固定化されたと判断した。

次いで、このスライドガラスに、100種類のオリゴDNAと特異的に結合するDNAを含む、標識化された試料を接触させて、洗浄した後、検出したところ、100種類全てのスポットから十分な強度を有した良好なシグナルが確認された。

以上の結果から、1種類の検査オリゴの固定化が確認された試験片では、その後実施されたハイブリダイゼーションの結果から、その他のDNAオリゴも確実に固定化されていることが確認された。

産業上の利用性

本発明の生体由来物質解析用試験片の製造方法においては、標識された生体由来物質の標識とは異なる、又は同一の被検出物質を、当該特異的結合物質とは独立に、溶解して又は均一に分散して含むため、低コストで、尚且つ簡単な方法により、試験片への特異的結合物質の固定化を検査することができる。

また、本発明の生体由来物質用試験片の製造方法においては、担体不良に起因する欠陥品をその製造過程において簡便に発見、排除することができるため、製造の歩留まりを向上させるだけでなく、ユーザーのサンプルの無駄使いや、試験片の欠陥による誤った解析結果を防ぐことができる。

請求の範囲

1. 担体上に、生体由来物質に対する特異的結合物質を含む溶液を供給し、当該所定位置に当該特異的結合物質を固定する工程を含む、標識化された生体由来物質解析用試験片の製造方法において、

当該溶液が、当該標識とは異なる又は同一の被検出物質を、当該特異的結合物質とは独立に、溶解して又は均一に分散して含むことを特徴とする方法。

2. 前記溶液を供給する工程、又は前記特異的結合物質を固定する工程の後に、前記被検出物質を検出する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

3. 前記被検出物質を検出する工程の後に、当該被検出物質を前記担体より除去する工程を更に含む、請求項 2 に記載の方法。

4. 前記被検出物質を検出する工程が、当該被検出物質についての、前記担体上の位置、形状、数、及び濃度の少なくとも 1 つを検出する工程である、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

5. 前記被検出物質が、前記生体由来物質、前記特異的結合物質、及び当該生体由来物質と当該特異的結合物質との複合体に特有の分光学的性質とは異なる分光学的性質を有する、請求項 1 乃至 4 の何れか一項に記載の方法。

6. 前記の分光学的性質が、吸光度である、請求項 5 に記載の方法。

7. 前記被検出物質が、インク、色素、顔料、及び量子ドットからなる群より選択される、請求項 1 乃至 6 の何れか一項に記載の方法。

8. 標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所に固定化する工程、及び

固定化されなかった当該検査物質を除去する工程を含む担体検査工程を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 7 の何れか一項に記載の方法。

9. 前記の固定化されなかった検査物質を除去する工程の後に、固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する工程を有することを特徴とする請求項 8 記載の方法。

10. 請求項 1 乃至 9 の何れか一項に記載の方法により製造された、生体由来物質解析用試験片。

11. 前記の生体由来物質に対する特異的結合物質が、DNAである、請求項 10 に記載の生体由来物質解析用試験片。

12. 担体上の特定個所に、生体由来物質に対する特異的結合物質を固定化させた生体由来物質用試験片の検査方法であって、

標識された検査物質を担体上に供給し、特異的結合物質とは異なる個所に固定化する工程と、

固定化されなかった検査物質を除去する工程とを有することを特徴とする生体由来物質用試験片の検査方法。

13. 前記の固定化されなかった検査物質を除去する工程の後に、固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する工程を有することを特徴とする請求項 12 記載の生体由来物質用試験片の検査方法。

14. 担体上の特定個所に、生体由来物質に対する特異的結合物質を固定化させた生体由来物質用試験片の検査方法であって、

被検出物質と特異的結合物質との混合物を担体上に供給し、特異的結合物質を特定個所に固定化する工程と、

標識された検査物質を担体上に供給し、前記固定化工程の特定個所とは異なる他の特定個所に固定化する工程と、

前記二つの固定化工程にて固定化されなかった特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程とを有することを特徴とする生体由来物質用試験片の検査方法。

15. 前記固定化されなかった特異的結合物質、検査物質、及び被検出物質を除去する工程の後に、担体上に残存する被検出物質及び固定化された検査物質の標識由来のシグナルを検出する工程を有することを特徴とする請求項14記載の生体由来物質用試験片の検査方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, C12Q1/00, C12M1/00, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, C12Q1/00, C12M1/00, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-249130 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 14 September, 2001 (14.09.01), & US 2001/0034027 A	1-15
A	JP 2000-235036 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 29 August, 2000 (29.08.00), & US 2001/0018185 A	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 12 June, 2003 (12.06.03)	Date of mailing of the international search report 24 June, 2003 (24.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/53, C12Q1/00, C12M1/00, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/53, C12Q1/00, C12M1/00, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-249130 A (日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) 2001. 09. 14 & US 2001/0034027 A	1-15
A	JP 2000-235036 A (富士写真フイルム株式会社) 2000. 08. 29 & US 2001/0018185 A	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 06. 03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3251